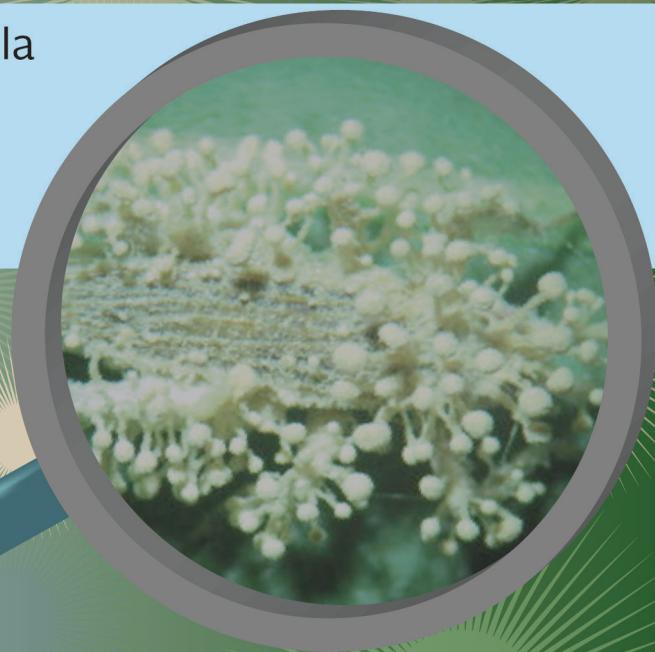


# Manual de Exploración

## para la Colecta de Hongos Entomopatógenos

Angélica María Berlanga Padilla  
Miguel Angel Ayala Zermeño  
Roberto Montesinos Matías  
José C. Rodríguez Rodríguez



Juntos alimentamos el futuro de México.

**SAGARPA**

SECRETARÍA DE AGRICULTURA,  
GANADERÍA, DESARROLLO RURAL,  
PESCA Y ALIMENTACIÓN



**SENASICA**  
SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD,  
INOCUIDAD Y CALIDAD  
AGROALIMENTARIA





# MANUAL DE EXPLORACIÓN

PARA LA COLECTA DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS

ANGÉLICA MARÍA BERLANGA PADILLA  
MIGUEL ANGEL AYALA ZERMEÑO  
ROBERTO MONTESINOS MATÍAS  
JOSÉ CARLOS RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ

Primera edición 2016  
Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA)  
Diseño Editorial  
Unidad de Promoción y Vinculación - SENASICA

ISBN: en trámite

Reservados todos los derechos. No se permite la reproducción, total o parcial de este libro ni el almacenamiento en un sistema informático, ni la transmisión de cualquier forma o cualquier medio, electrónico, mecánico, fotocopia, registro u otros medios sin el permiso previo y por escrito de los titulares del Copyright

# DIRECTORIO

M.C. José Eduardo Calzada Rovirosa  
*Secretario de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación*

M.V.Z. Enrique Sánchez Cruz  
*Director en jefe del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria*

Dr. Francisco Javier Trujillo Arriaga  
*Director General de Sanidad Vegetal*

M.C. José Abel López Buenfil  
*Director del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria*

M.C. Hugo César Arredondo Bernal  
*Subdirector de Control Biológico*

Centro Nacional de Referencia de Control Biológico  
Km 1.5 Carretera Tecomán-Estación FFCC  
Col. Tepeyac. C.P. 28110  
Tecomán, Col. México  
Tel: (313) 324 0745  
Fax: (313) 324 2773  
Correo electrónico: [dgsv.cnrf1@senasica.gob.mx](mailto:dgsv.cnrf1@senasica.gob.mx)

# AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen las valiosas observaciones y contribuciones realizadas al presente documento por los siguientes investigadores:

Dr. José Francisco Miranda Martínez, del Departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa

Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez, Lab. Control de Biológico, Centro de Investigación en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos

Ing. Marco Antonio Mellín Rosas, del Departamento de Hongos Entomopatógenos; Centro Nacional de Referencia de Control Biológico

Dr. Martín Palomares Pérez del Departamento de Insectos Entomofágos; Centro Nacional de Referencia de Control Biológico

M. en C. Hugo César Arredondo Bernal, Subdirector del Centro Nacional de Referencia de Control Biológico

# ÍNDICE

INTRODUCCIÓN .....	7
MATERIAL PARA LA EXPLORACIÓN Y COLECTA .....	9
Material y equipo .....	10
Documentos .....	10
Características de insectos infectados por hongos entomopatógenos .....	13
ASPECTO COMÚN DE INSECTOS INFECTADOS POR HONGOS .....	15
1. Cambios de coloración .....	16
2. Signos físicos de la infección causada por hongos entomopatógenos .....	17
3. Comportamiento inusual .....	18
4. Cambios en su forma y textura .....	19
TÉCNICAS DE COLECTA DE INSECTOS INFECTADOS POR HONGOS ENTOMOPATÓGENOS .....	21
1. Colecta directa .....	22
2. Colecta indirecta .....	23
2.1. Cría de <i>Galleria mellonella</i> .....	24
2.2. Cría de <i>Tenebrio molitor</i> .....	25
2.3. Muestras de suelo .....	26
2.4. Técnica del insecto trampa .....	26
2.5. Tratamiento de muestras de suelo en medios selectivos .....	28

MANEJO Y ENVÍO DE MUESTRAS .....	31
COLECTA DE PLAGAS DE IMPORTANCIA AGRÍCOLA	
INFECTADOS CON HONGOS ENTOMOPATÓGENOS .....	33
Psílido asiático en los cítricos (PAC) .....	34
Cochinilla rosada del hibisco .....	35
Barrenadores de aguacatero .....	36
Moscas de la fruta .....	37
Broca del café .....	38
Pulgones en cítricos .....	39
Gallina ciega .....	40
Langostas y chapulines .....	41
LITERATURA CITADA .....	43

# INTRODUCCIÓN

A pesar de que los hongos entomopatógenos (HE) comprenden un grupo heterogéneo de más de 100 géneros, sólo un pequeño porcentaje de estos ha sido incluido en programas de control microbiano. Considerando que algunos de estos géneros tienen un amplio rango de hospederos y es posible aislarlos en diferentes zonas geográficas, se evidencia la gran diversidad genética que puede encontrarse entre los aislamientos de una misma especie. Los HE ocupan un lugar importante en el control microbiano de insectos plaga, ya que virtualmente todos los órdenes de insectos son susceptibles a enfermedades fúngicas. Frecuentemente, los hongos disminuyen poblaciones de insectos a través de epizootias. Por tal motivo, resulta indispensable que en los programas de control biológico y manejo integrado de plagas se colecten, purifiquen y conserven estos microorganismos. Esto permitirá seleccionar a aquellos que, de acuerdo a sus características, sean más propicios a ser utilizados en una estrategia de control microbiano por incremento (Humber 1991).

El uso de los organismos entomopatógenos, precisa del reconocimiento de las diversas enfermedades de los insectos a partir del estudio de su etiología, sintomatología, patogénesis y epizootiología. En términos generales, se debe realizar la recolección y análisis de hechos y datos como son: la historia de la enfermedad y el examen, tanto físico como de laboratorio. El examen físico, comprende la inspección general, a partir del análisis macro y microscópico; mientras que el examen de laboratorio, implica el aislamiento y estudio del patógeno y del hospedante, siempre observando el desarrollo de la enfermedad (Tanada y Kaya 1993).

En prácticamente todos los hábitats en los que viven los insectos (ecosistemas naturales terrestres, acuáticos, agro-ecosistemas, incluso en colonias de insectos de laboratorio y comerciales), es factible encontrar especímenes de estos animales infectados con HE. Con frecuencia, es el técnico o investigador quien se percata de la enfermedad del insecto, al percibir cambios en su comportamiento, siendo este síntoma una de las formas más comunes de reconocer a los insectos enfermos a causa de HE. La búsqueda de insectos infectados con HE se dirige a insectos que presentan una apariencia diferente al resto de la población en su hábitat natural, es una de las formas más comunes de reconocer los insectos enfermos.

Aunque muchos agentes patógenos suelen estar presentes en una enzootia, episodio que se caracteriza por presentar bajos niveles de insectos enfermos, es durante las epizootias cuando es fácil encontrar, en las poblaciones de insectos, un inusual número de especímenes infectados (Lacey y Solter 2012).

Para incrementar el acervo genético de la Colección de Hongos Entomopatógenos (CHE-CNRCB), perteneciente al Centro Nacional de Referencia de Control Biológico, se ha implementado la exploración en cultivos agrícolas de importancia económica, los cuales están bajo vigilancia epidemiológica, en busca de insectos infectados por HE. El fin de esta exploración es aislar, purificar y conservar la virulencia de los HE para, una vez identificados y evaluada su calidad, puedan utilizarse en la generación de tecnología que implique el establecimiento de programas de control biológico.



# MATERIAL PARA LA EXPLORACIÓN Y COLECTA

Los materiales y equipo necesarios para realizar una exploración en busca de HE, deberán ser organizados y preparados con anticipación, siempre considerando el tipo de cultivo y la (s) plaga (s) que son objeto de la misma.

## Material y equipo

- Viales de plástico de diferentes tamaños
- Marcador de tinta indeleble
- Bolsas de plástico y de papel estroza
- Cámara fotográfica
- Pinceles
- Lupa 20X y 30X
- Hieleras
- Pinzas entomológicas
- Plumas, lápices y borrador
- Tablas de apoyo con broche de presión
- Tijera para podar
- Pala
- GPS
- Navaja multifuncional

## Documentos

- Formatos para toma de datos
- Información de la región
- Identificaciones oficiales del personal de exploración
- Mapas

La información contenida en los formatos de Registro de Colecta de Especímenes, tendrá que ser almacenada en una base de datos. Además, se considera necesario crear un expediente físico de este documento. La ficha deberá contar al menos con la información que se indica en el Cuadro 1.

# Manual de Exploración para la Colecta de Hongos Entomopatógenos

**SAGARPA**  
SECRETARÍA DE AGRICULTURA,  
GANADERÍA, DESARROLLO RURAL,  
PECUARIA Y MEDIOAMBIENTE



Dirección General de Sanidad Vegetal  
Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria  
Centro Nacional de Referencia de Control Biológico  
Colección de Hongos Entomopatógenos



Registro de Colecta de Especímenes

No DE REGISTRO CHE \_\_\_\_\_

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
FECHA:			
LUGAR:			
COORDENADAS:			
UBICACIÓN DEL PREDIO:			
NOMBRE DEL COLECTOR:			
INSECTO (DE SER POSIBLE FAMILIA, GENERO, ESPECIE):			
SIGNOS Y SÍNTOMAS, DEL INSECTO:			
PREVALENCIA DE INSECTOS MUERTOS:			
CULTIVO HOSPEDERO:			
CONDICIONES DE CLIMA (HR, TEMP):			
OBSERVACIONES:			

Cuadro 1. Registro de Colecta de Especímenes

### CARACTERÍSTICAS DE INSECTOS INFECTADOS POR HONGOS ENTOMOPATÓGENOS

Debido a su crecimiento característico, los hongos fueron los primeros microorganismos que se detectaron causando enfermedades sobre insectos. No obstante, es importante señalar que algunos HE no presentan un crecimiento visible en la superficie de los insectos o, con frecuencia, pueden producir estructuras que escapen a la simple observación. Además, en ocasiones, su crecimiento y desarrollo se ve limitado por las condiciones ambientales (Tanada y Kaya 1993). Por lo anterior, la detección de estos organismos entomopatógenos puede dificultarse y resulta necesario contar con conocimientos respecto a la biología y hábitos del insecto plaga, así como de los hospederos alternos, todo con el fin de hacer exitosa la exploración. A este respecto, resulta oportuno introducir el término “colecta”, que se refiere a la extracción de ejemplares, partes o derivados de vida silvestre, del hábitat al que pertenecen (LGVS, marzo del 2014).

En el inicio de la enfermedad ocasionada por un HE, el insecto presenta pocos o ningún síntoma; en algunos casos, es posible observar manchas necróticas (Fig.1a), producidas en los sitios de penetración del hongo (Poinar y Thomas 1978, McCoy *et al.* 1988). A medida que el proceso infeccioso continúa, el insecto se agita, disminuye su actividad, reduce su apetito y pierde coordinación. En esta etapa es frecuente observar cambios en su coloración (Fig.1b). En la investigación realizada por McCoy *et al.* (1988), se establece que existe una tendencia de los insectos infectados a desplazarse a la parte alta del follaje, o bien a la superficie del suelo en el caso de plagas rizófagas. Eventualmente el insecto se paraliza y la momificación del insecto es manifiesta (Fig.1c), siendo esta precisamente la característica típica de la infección por hongos. De acuerdo a Tanada y Kaya (1993), una vez acontecida la muerte, el cuerpo del insecto es cubierto por micelio, a partir del cual se inicia el proceso de conidiación (Fig.1d).



**Figura 1.**-Características de insecto infectado por hongos entomopatógenos. **a) Manchas necróticas ocasionadas por la penetración de HE en larva de *Galleria mellonella*.** **b) Adultos de *Schistocerca piceifrons* evidenciando el color "rojo" característico debido a la infección por *Metarhizium acridum*.** **c) Aspecto típico de larvas de lepidópteros momificadas.** **d) Esporulación de *Metarhizium rileyi* sobre *Spodoptera frugiperda*.**



Araña Infeccionada con *Torrubiella*



# ASPECTO COMÚN DE INSECTOS INFECTADOS POR HONGOS

## 1. Cambios de coloración

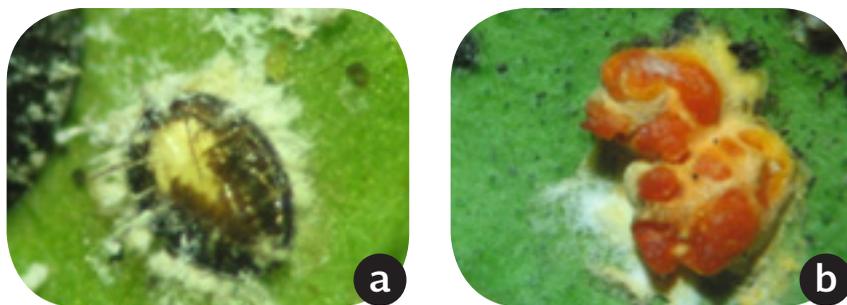
Uno de los primeros síntomas notables de insectos enfermos en una población, es la coloración que les distingue de los otros miembros sanos, este síntoma pueden presentarse en insectos vivos o muertos. Los cambios de color, ocasionados por la infección de entomopatógenos, se asocian generalmente a los insectos con tegumentos transparentes y semi-transparentes, como larvas de coloraciones claras y las formas larvarias de los gorgojos, larvas de himenópteros y muchos grupos de insectos acuáticos, principalmente dípteros. La variación en el color en un insecto enfermo puede ser leve o drástica. Respecto a esto, se ha observado una amplia gama de cambios de coloración, que van desde el blanco, gris, rojo, naranja, amarillo, azul, verde, marrón y negro. Las áreas de melanización en la cutícula de los insectos, manchas necróticas, se deben a la respuesta inmune del insecto ante la infección de los HE (Lacey y Solter 2012).

Un ejemplo común del cambio de la coloración en el insecto, ocurre durante la infección ocasionada por *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill., que al crecer sobre su hospedero, produce un pigmento de color rojo, identificado como oosporeina, el cual posee propiedades antibióticas, y que le otorga esta coloración característica al cadáver. La función principal de este compuesto, es impedir el crecimiento de bacterias, lo que permite el desarrollo del entomopatógeno. Asimismo, *B. bassiana*, produce los pigmentos amarillos bassianina y tenellina (Ferron 1981). Por otra parte, se ha observado que los ácaros infectados por *Hirsutella thompsonii* (Fisher), adquieren diferentes intensidades de rojo, desde tonos claros hasta muy oscuros, manifestándose en algunas poblaciones de ácaros distintas tonalidades, predominando el color rojo ladrillo (Cabrera 1977).

## 2. Signos físicos de la infección causada por hongos entomopatógenos

La observación cuidadosa del estado físico del cadáver del insecto, permite asociar a este con el agente que propició su muerte. Por ejemplo, algunos HE con frecuencia producen un crecimiento exuberante y colorido sobre la superficie del insecto. La ubicación de este crecimiento en los tejidos infectados, puede ser una característica de ciertos entomopatógenos, el cual puede ser visible a través de la cutícula (Lacey y Solter 2012). *A. B. bassiana* se le ha considerado un hongo cosmopolita. A este hongo se le ha conocido como “muscardina blanca”, por el aspecto característico que su crecimiento propicia sobre el cadáver. Al morir el insecto, este hongo continúa creciendo, invadiendo completamente el cadáver. Posteriormente, si la atmósfera cuenta con las condiciones de humedad adecuadas, ocurre el desarrollo del hongo sobre el insecto momificado; el micelio emerge a través del integumento y desarrolla conidióforos y estos a su vez conidios, son estas etapas las que propician su crecimiento característico (Ferron 1978). En el caso de *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin, en su infección sobre mosca pinta, pueden observarse los signos típicos, como son su crecimiento micelial de color blanco en adultos y ninfas, seguido de una esporulación abundante de color verde. Cuando infecta a ninfas, sólo en raras ocasiones acontece la esporulación sobre el cuerpo de éstas, esto puede deberse a que las condiciones abióticas son desfavorables para ello (Alves 1986).

Por otra parte, el estado de infección de *Aschersonia aleyrodis* (Webber) sobre mosquitas blancas o mosca prieta de los cítricos se caracteriza por un cambio visible de color del hospedero infectado, la ninfa toma una coloración brillante y su cuerpo es poco translucido comparado con el de una ninfa sana, el proceso de infección continúa con la aparición de micelio externo, el cual se observa usualmente alrededor del cuerpo del insecto (Fig. 2a). Posteriormente, el hongo presenta un crecimiento vigoroso de color blanco y forma un estroma que cubre la superficie corporal del insecto, que con el tiempo cambia de color, las diferentes especies de *Aschersonia* pueden distinguirse por el color del estroma y los conidios que pueden ser de diferentes tonalidades rojo, café, anaranjado o amarillo (Fig. 2b) (Fransen 1990).



**Figura 2.-** Mosca prieta de los cítricos.

a) Crecimiento inicial de *Aschersonia aleyrodis* sobre ninfa.

b) Estroma esporulado de *Aschersonia aleyrodis*.

Otros signos a considerar, son las estructuras de resistencia que los HE pueden producir bajo condiciones ambientales extremas. Por ejemplo, bajo estas condiciones, pueden presentar estructuras de pared celular gruesa llamadas clamidosporas, que los mantienen viables por tiempos prolongados (Prior 1992), un ejemplo de ello es *Metarhizium rileyi* (Farl.) Kepler S.A. Rehner & Humber. Este HE se caracteriza porque, en condiciones de temperaturas y humedad bajas, produce hifas de doble pared celular, clamidosporas y cuerpos de reposo con grandes cantidades de lípidos, localizadas en las cavidades del cuerpo del insecto, las cuales le sirven para sobrevivir hasta que las condiciones ambientales son favorables para su desarrollo (Pendland 1982, McCoy *et al.* 1988).

### 3. Comportamiento inusual

Si se considera que en condiciones normales los insectos son voraces, su desinterés por alimentarse es señal de este tipo de comportamiento. Otros son la irritabilidad y la dispersión o agregación inusual. Además, se sabe que los insectos infectados con ciertos hongos o virus, suelen subir a los puntos altos de las plantas hospederas, situándose allí justo antes de su muerte (Lacey y Solter 2012). Por ejemplo, los principales síntomas que presentan los especímenes adultos de la mosca pinta, al ser infectados por *M. anisopliae*, son movimientos lentos, desinterés por el alimento y disminución en su radio de vuelo. En el caso de las hembras, estas no ovipositan más; mientras que las ninfas infectadas por este HE, se caracterizan porque disminuyen sus movimientos, para después morir y adquirir un aspecto momificado (Alves 1986).

El comportamiento de los ácaros infectados por *H. thompsonii*, se caracteriza por presentar movimientos lentos y desordenados, ejecutan contorsiones y elevan su cuerpo, sosteniéndolo en la parte posterior con los lóbulos. En estados de infección avanzados, las hifas del hongo parecen fijar los ácaros a las hojas, dándoles la apariencia de estar cubiertos con una tela de araña vidriosa blanquecina (Cabrera 1977).

## 4. Cambios en su forma y textura

Una característica de los insectos infectados con virus o bacterias, son los cambios físicos que sufren. Sin embargo, generalmente esto no ocurre cuando se trata de infecciones debidas a HE ya que, en este caso, la característica principal es la momificación del cadáver del insecto, en la cual su cuerpo se torna rígido sin afectar su forma (Kaya y Vega 2012). En algunas ocasiones, se han encontrado insectos con estructuras llamativas sobre su cuerpo, las cuales al ser analizadas se determina que son parte del crecimiento del hongo causante de la infección. Algunos ejemplos característicos se observan en la Figuras 3a, b, c y d.



**Figura 3.-** Estructuras de hongos desarrolladas sobre insectos.

a) *Torrubiella* sp. en pulgón.

b) *Hirsutella* sp. sobre psílido asiático de los cítricos.

c) *Cordyceps* sp. en larva de coleóptero.

d) *Cordyceps* sp. en pupa de chicharra cantadora.



*Paraleyrodes perseae*  
Infectada con un Entomophthoral



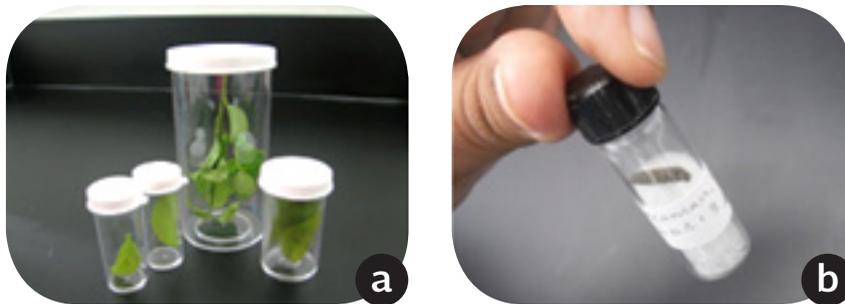
# TÉCNICAS DE COLECTA DE INSECTOS INFECTADOS POR HONGOS ENTOMOPATÓGENOS

Al igual que con cualquier organismo, las técnicas de colecta a utilizar, dependen directamente de los objetivos y, de ser necesario, estas podrán adaptarse para cumplir con las metas establecidas. La búsqueda de insectos infectados con HE, requiere la aplicación de una variedad de métodos debido, principalmente, al gran número de especies y de hábitos de vida que presentan. La mayoría de estos métodos responden a objetivos específicos; sin embargo, en el caso de HE, pueden ser divididos, de manera muy general, en técnicas de colecta directas e indirectas.

### 1. Colecta directa

En este caso, la búsqueda se dirige a localizar insectos micosados o con signos aparentes de infección por hongos. También se deben incluir insectos que muestran cambios de coloración, ya sean vivos o muertos, además de aquellos que tengan comportamiento diferente al resto de la población. El material colectado se debe colocar en viales de plástico o vidrio, los cuales tendrán que ser apropiadamente etiquetados. Durante la colecta en campo, los insectos deberán separarse del sustrato sobre el que se encuentran con unas pinzas finas y colocarse individualmente en recipientes limpios y secos. Cuando el cadáver del insecto se encuentra adherido a la planta, se recomienda colectarlo junto con la porción de esta para evitar dañarlo. Insectos pequeños como escamas, ácaros y mosquita blanca, también se pueden colectar de esta manera (Fig. 4a).

El contenedor para transportar el material colectado deberá tener una adecuada ventilación, de manera que permita el intercambio de gases y evite la condensación o la retención de la humedad en exceso. Se recomienda agregar un agente de secado, como gel de sílice o papel filtro en el recipiente utilizado (Fig. 4b). De acuerdo a lo reportado por Lecuona (1996), durante el almacenamiento temporal, una técnica para evitar o retardar la germinación de los hongos saprobios en las muestras, es disminuir la humedad relativa (HR). Los insectos enfermos deben mantenerse a bajas temperaturas (en una hielera o refrigerador), hasta que puedan ser examinados en el laboratorio. Las bajas temperaturas también ayudan a reducir el estrés en los organismos entomopatógenos, además de retardar el crecimiento de saprobios, previo a su diagnóstico.



**Figura 4.-** Colecta de insectos.

- a) Forma de recolectar insectos pequeños o adheridos al sustrato.
- b) Insecto infectado recolectado en forma individual.

Cuando se colectan insectos vivos infectados, se deben mantener en el medio donde se encontraron (follaje, suelo o agua). En el caso de plagas cuarentenarias, no es permitida su movilización y la colecta tendrá que ser exclusivamente de insectos muertos con signos de infección por HE (NIMF2, 2007). Los insectos acuáticos, pueden ser transportados en plantas que crecen en esos hábitats, inmersas en agua.

## 2. Colecta indirecta

Para la supervivencia de los HE en la naturaleza, el suelo proporciona condiciones físicas favorables ya que, a diferencia del ambiente propio del follaje de las plantas, los patógenos no están sujetos a la destrucción por radiación; además de que la humedad es relativamente alta y estable en él (Barbercheck 1992). Es por ello que este es uno de los hábitats naturales donde, con frecuencia, es posible aislar diversas especies de HE (Meyling y Eilenberg 2007). La obtención de HE a partir de suelo se realiza a través de una colecta indirecta, que no es más que la obtención del material a partir de suelo, utilizando ya sea la técnica del insecto trampa o el aislamiento en medios selectivos. El principal obstáculo para el aislamiento de HE con medios selectivos, es su crecimiento lento, comparado con los hongos saprobios oportunistas que se encuentran en el suelo. Para el aislamiento de HE en muestras de suelo, se han desarrollado algunos medios de cultivo selectivos que incluyen antibióticos (Anexo 1), tales como cloranfenicol,

tetraciclina o estreptomycin, utilizados para inhibir el crecimiento de bacterias, además de algunos fungicidas como dodina y benomilo en concentraciones bajas (Meyling 2007).

La principal ventaja de la técnica de insecto trampa, es que sólo los hongos patógenos de insectos causarán infección sobre las larvas, lo que facilitará su aislamiento. Sin embargo, se requiere contar con crías de insectos susceptibles a la infección por HE; algunas de las especies que se han empleado con este propósito son, la palomilla de la cera *Galleria mellonella* Linnaeus (Lepidoptera: Pyralidae) y el gusano de la harina *Tenebrio molitor* Linnaeus (Coleoptera: Tenebrionidae), por ser insectos que se crían fácilmente en el laboratorio y las colonias se pueden establecer sin tener grandes recursos económicos y/o de equipo.

## 2.1 Cría de *Galleria mellonella*

Existe una gran variedad de dietas para la cría de la palomilla de la cera. En la mayoría de ellas, se utiliza una combinación de cereales hidrolizados para niños, leche en polvo, glicerina líquida, azúcar, levadura de cerveza, polen, harinas de cereales, copos de avena, salvado de trigo y miel (Anexo 2). Cualquier dieta con estos componentes puede funcionar, incluso una mezcla de salvado de trigo, miel y un poco de glicerina líquida, para el caso de zonas con muy poca humedad ambiental, permite el desarrollo de la palomilla. El alimento debe colocarse en un contenedor o frasco de vidrio de boca ancha que permita manipular los insectos, con una tapa adaptada con una malla fina (16 x 16 hilos por cm<sup>2</sup>) para favorecer la ventilación y evitar que escapen las larvas de los primeros instares que son muy pequeñas (Fig. 5 a y b). El contenedor con los insectos se debe mantener a una temperatura de entre 28 a 32°C (Klingen *et al.* 2002).



Figura 5.- Etapas de la cría de *Galleria mellonella*. a) Larvas. b) Adultos.

## 2.2 Cría de *Tenebrio molitor*

Para el establecimiento de la colonia de *T. molitor*, se requieren cajas de plástico rectangulares transparentes, donde los insectos son mantenidos a temperatura ambiente, alimentándolos con una mezcla de avena y salvado de trigo estéril (1:1). Para que los insectos se hidraten, es necesario colocar al menos una torunda de algodón húmedo estéril sobre una caja de Petri. Periódicamente, deben retirarse las pupas que van apareciendo en las cajas de larvas; de la misma manera se hace con los adultos que emergen en la caja de pupas, esto con el fin de evitar el canibalismo debido a la inmovilidad de estas últimas (Fig. 6a y b).



Figura 6.- Cría de *Tenebrio molitor*. a) Contenedor con pupas. b) Adultos en etapa de oviposición.

## 2.3 Muestras de suelo

Para este método, en cada zona a evaluar, se colectan de tres a cinco muestras de suelo superficial (500 g cada una), excavando a una profundidad de 10 a 15 cm. Cada una de las muestras se mezcla individualmente con una pala y, una vez mezclada, se toma una porción representativa de la misma, la cual debe ser depositada en una bolsa de plástico previamente etiquetada. Durante todo el transcurso de la colecta, las muestras deberán mantenerse en hieleras. Se recomienda procesar las muestras lo más pronto posible, dentro de los primeros 5 días después de la colecta (Zimmermann 1986).

## 2.4 Técnica del insecto trampa

De acuerdo a Keller *et al.* (2003), el método de insecto trampa con *G. mellonella* para la colecta de HE, es más sensible que el uso de medios de cultivo selectivos, siendo útil para el aislamiento y la identificación de hongos autóctonos presentes en los suelos. Para este método de colecta, son pocos los estudios que han evaluado el uso de varios insectos cebo de diferentes taxones. Klingen *et al.* (2002) encontraron que larvas de dípteros se infectan de hongos de diferentes géneros en comparación con *G. mellonella*. Específicamente, a partir de larvas de *Delia floralis* Fallen (Diptera: Anthomyiidae) fue posible aislar, con más frecuencia, *Tolypocladium cylindrosporium* Gams que con *G. mellonella*. Por ello, el uso de la técnica del insecto cebo, puede ser considerada como un método de aislamiento selectivo.

Para procesar la muestra, se utiliza suelo húmedo, aunque no hay información que indique la cantidad de humedad ideal. En la investigación hecha por Meyling (2007), se menciona que requiere tiempo determinar los mejores contenidos de humedad del suelo y, como guía aproximada, este no debe ser demasiado húmedo, no permitiendo la condensación en el interior del recipiente, evitando que se formen grumos. En ciertas ocasiones, la muestra tiene la humedad suficiente para ser procesada; sin embargo, en casos en que esta sea demasiado húmeda, deberá exponerse al sol hasta quitar el exceso de humedad. La cantidad de suelo a muestrear, dependerá de la capacidad de los contenedores, los cuales preferentemente deberán llenarse, de tal manera, que las larvas estén siempre en contacto con el suelo.

En esta técnica, es común utilizar contenedores de plástico con tapa, a los que se le agregan de 10 a 20 larvas de *G. mellonella* o *T. molitor* del quinto o sexto estadio. Hecho esto, los contenedores se tapan, incubándose a 27°C. Periódicamente, los contenedores deben invertirse para asegurar que las larvas estén expuestas al hongo. Después de 14 días, cuando la muestra de suelo contiene HE, es posible observar las larvas infectadas.



**Figura 7.- Técnica del insecto trampa.**

a y b) Introducción de larvas de *Galleria mellonella* en contenedores con muestras de suelo.

c) Larvas infectadas con *Beauveria* sp.

d) Larva infectada con *Metarhizium* sp.

Después de 7 días de incubación, deben separarse las larvas muertas del suelo y colocarse individualmente en una cámara húmeda para favorecer el desarrollo del hongo. Previamente, es necesario desinfectarlas con hipoclorito de sodio comercial (cloro) al 0.5% durante 1 min; transcurrido este tiempo, deben lavarse dos veces con agua destilada estéril. En la investigación realizada por Lacey y Solter (2012), se recomienda desinfectar a los especímenes con alcohol al 70%, enjuagarlos con agua estéril para, posteriormente, tratarlos con cloro comercial durante un minuto y, finalmente,

se deben lavar con agua estéril. El exceso de humedad se elimina colocando los insectos sobre papel filtro estéril, posteriormente se colocan en cámara húmeda utilizando una solución de sulfato de potasio ( $K_2SO_4$ ) al 11% para alcanzar una humedad relativa de 97% (Goettel e Inglis 1997) e incubar a 25°C (Fig. 7b, c).

Cuando el crecimiento del hongo es evidente, no es necesario el uso de la cámara húmeda, simplemente debe eliminarse el suelo adherido al cuerpo del espécimen con un pincel fino, auxiliándose con el microscopio de disección para no contaminar al entomopatógeno. A continuación, para el aislamiento, se transfieren las estructuras del hongo a cajas de Petri con medio de cultivo (PDA o SDA), adicionado con antibiótico (cloranfenicol 500 mg/L). Posteriormente se realiza la identificación, considerando las estructuras morfológicas por comparación en claves taxonómicas (Barnett y Hunter 1998; Humber 2012).

## 2.5 Tratamiento de muestras de suelo en medio selectivos

Una amplia gama de hongos están presentes en el suelo y tienen diversas funciones ecológicas. La mayoría de estos hongos, junto con una gama de bacterias, pueden crecer en medios de cultivo artificiales. Estas habilidades han sido explotadas durante mucho tiempo para aislar microorganismos a partir de muestras del suelo, además, sustratos específicos han sido desarrollados para seleccionar ciertos grupos de microorganismos. También se han desarrollado algunos medios selectivos para el aislamiento de HE.

Un ejemplo de este tipo de medio, es el sugerido para el aislamiento de especies de *Metarhizium*, el cual es conocido como medio semi-selectivo Veens, el cual contiene cloranfenicol, así como los fungicidas dodina y cicloheximida (Goettel y Inglis 1997). A partir de este medio, se han hecho modificaciones con el objetivo de optimizar los resultados de aislamiento basados en la experiencia. Por ejemplo, Hu y St. Leger (2002) lo utilizaron para aislar *M. anisopliae*, excluyendo el uso de la cicloheximida, para permitir que otros hongos pudieran desarrollarse. En otros casos, se ha modificado para volver a aislar conidios de HE aplicados en campo, esto con el fin de estimar su persistencia en el suelo, así como su movimiento vertical (Meyling 2007).

Para procesar las muestras de suelo con medios selectivos, se toman seis muestras (25 g cada una) de cada lugar de colecta, llevándose a bolsas de plástico de polipapel estéril por separado. En tubos Eppendorf de 2 mL, se depositan  $0.35 \text{ g} \pm 0.05 \text{ g}$  de suelo de cada bolsa, agregándose 1 mL de agua destilada estéril a cada tubo. Posteriormente, se agita el tubo por 30 seg y se toma una alícuota de 50  $\mu\text{L}$ , sembrándose en cada caja de Petri con medio selectivo (Anexo 1), esparciendo con varilla de vidrio y se incuba a  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ ; en este método se debe considerar la especie del HE a ser aislado. Transcurridos tres días, se deben realizar observaciones (Fernández *et al.* 2010). Las colonias con características similares a HE, deben llevarse a un medio de cultivo selectivo específico los aislamientos buscados. Una vez hecho esto, se debe realizar la identificación de las características morfológicas que aseguren que se trata de un hongo patógeno de insectos.



Adulto de *Tenebrio molitor*  
micosado por *Metarhizium anisopliae*



# MANEJO Y ENVÍO DE MUESTRAS

Una vez que los insectos infectados con HE se han recolectado en campo, este deberá ser enviado a la brevedad posible al Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (CNRCB) ubicado en Tecomán, Colima, con las siguientes recomendaciones:

- Los insectos se deben enviar en contenedores individuales
- Los insectos adheridos al sustrato ya sea hoja, tallo o fruto deben depositarse con el sustrato
- Las muestras deben enviarse secas, por lo que es recomendable no agregar alcohol, ni ponerlos en cámara húmeda
- Los insectos colectados en el suelo deben estar limpios evitando partículas potencialmente contaminantes
- Cada contenedor deberá llevar los datos correspondientes (Cuadro 1)
- Utilizar hieleras de poliestireno con geles congelados para el envío, evitando que los viales tengan contacto directo con los geles

El material deberá ser remitido vía paquetería exprés al CNRCB:

Km 1.5 Carretera Tecomán-Estación FFCC, Col. Tepeyac, Tecomán, Colima, C.P. 28110. Tel. (313) 324 07 45, [dgsv.cnrfl@senasica.gob.mx](mailto:dgsv.cnrfl@senasica.gob.mx)



# COLECTA DE PLAGAS DE IMPORTANCIA AGRÍCOLA INFECTADOS CON HONGOS ENTOMOPATÓGENOS

Una estrategia ecológicamente segura para la utilización de HE en el control de plagas, se basa en la identificación de sus patógenos naturales, lo cual se hace con el fin de seleccionar el patógeno con mayor potencial, tomando como criterio, su virulencia, persistencia y especificidad. El universo de enemigos naturales de plagas agrícolas es diverso y abundante. Con este antecedente, el CNRCB ha planteado la búsqueda de especímenes en el ambiente en el que están presentes las plagas, considerando diferentes regiones agrícolas de México, teniendo como principal propósito el contar con el mayor número de genotipos de HE y poder seleccionar aquellos que cuenten con las mejores características para controlar insectos bajo condiciones de campo. A la fecha, la CHE-CNRCB, cuenta con una colección de más de 600 aislados de HE, los cuales han sido obtenidos de diversas regiones y cultivos agrícolas. A continuación se describen algunos ejemplos de exploraciones de HE realizada por el CNRCB.

### Psílido asiático de los cítricos (PAC).

La exploración del psílido asiático de los cítricos, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae), se realiza sobre ninfas y adultos de esta plaga. El muestreo se efectúa sobre brotes tiernos de cítricos, incluyendo tallos y hojas. Se deben coleccionar los especímenes que presentan cambio de coloración, momificación o presencia de micelio y conidios en cualquier parte de su cuerpo (Fig. 8a). Los PAC infectados por hongos, generalmente se encuentran adheridos a las hojas o tallos, por lo que se deben recolectar junto con el sustrato; un ejemplo de esto son las ninfas que se presentan en la Figura 8b, las cuales aún se mantienen adheridas al tallo. Los insectos muertos sin signos aparentes de infección, también pueden colectarse para continuar el proceso infectivo. De ser este el caso, en el laboratorio se pueden adecuar las condiciones apropiadas para lograr su desarrollo.



**Figura 8.**-*Diaphorina citri*.

a) Adulto con micelio y sinemas de *Hirsutella citrififormis*.

b) Ninfas momificadas por infección de *Isaria*.

### Cochinilla rosada del hibisco

Tomando en cuenta la biología de la cochinilla rosada (*Maconellicoccus hirsutus* (Green) (Hemiptera: Pseudococcidae) y los daños que ocasiona en las plantas hospederas, la búsqueda deberá dirigirse especialmente hacia las partes en crecimiento en las que se visualicen deformaciones de brotes (Fig. 9a) o, cuando el daño es severo, en toda la planta. Una vez ubicadas las colonias de la cochinilla, deberán colectarse junto con el brote, ya que por su tamaño, coloración y la presencia de fibras de cera, se dificulta la detección directa de estos patógenos, por lo que resulta necesario que las muestras sean analizadas con ayuda del microscopio, lo que facilitará la detección de los entomopatógenos presentes.

La cochinilla rosada es una plaga bajo vigilancia fitosanitaria, debido al riesgo constante de que se propague a otras áreas. Cuando se colectan muestras de esta plaga, estas deben colocarse en recipientes con tapa hermética y depositarse en doble bolsa, asegurándola con cinta (Fig.9b). Una vez en el laboratorio, las muestras deben procesarse inmediatamente, considerando los cuidados pertinentes para evitar su propagación. Al finalizar el proceso de análisis, el material residual debe ser incinerado.

La tonalidad rosa a rojiza es un indicativo, en algunos insectos, de la presencia de patógenos. Sin embargo, al ser este el color natural de la cochinilla rosada, no puede ser considerado un signo de infección. Por ello, en el caso de esta plaga, será necesario ubicar los especímenes muertos y examinar los insectos en laminillas y, a partir de esto, determinar la presencia de entomopatógenos. Las especies de hongos reportadas como patógenos de Pseudococcidos son: *Lecanicillium aphanocladii* Zare & W. Gams, *L. psalliotae* (Treschow) Zare & W. Gams, *M. anisopliae*, *Isaria fumosorosea* Wize, *Hirsutella cryptosclerotium* Fern.-García, H.C. Evans & Samson, y *B. bassiana* (Humber 2013).



**Figura 9.-** Colecta de *Maconellicoccus hirsutus*.

a) Brotes de eritrina con colonias de cochinilla rosada.

b) Colecta de cochinilla rosada, acondicionadas en doble bolsa y selladas con cinta.

### Barrenadores del Aguacatero

El conjunto de barrenadores del hueso y de la rama del aguacate como *Copturus aguacatae* Kissinger, *Conotrachelus perseae* Barber, *C. aguacatae* Barber, *Heilipus lauri* Boheman (Coleoptera: Curculionidae) y *Stenoma catenifer* Walsingham (Lepidoptera: Oecophorinae), son insectos que atacan directamente las ramas y frutos durante su desarrollo. Las larvas al atacar el fruto, lo perforan o barrenan y se alimentan de la semilla o “hueso” hasta destruirlo y provocar su caída (Domínguez *et al.* 1988). La exploración de HE sobre barrenadores del aguacatero, debe ser dirigida a los adultos, así como en los frutos caídos y en el suelo. Además, debe considerarse la búsqueda de pupas, ya que es un estadio susceptible al ataque de estos microorganismos. En el caso de barrenadores de rama, se deben observar principalmente las ramas jóvenes.

El muestreo de pupas se realiza en áreas de sombra del mismo árbol de aguacatero, preferentemente donde se observen frutos caídos. La toma de muestra de suelo, se realiza entre los 10 ó 15 cm de profundidad; posteriormente se pasa por una criba, con el propósito de eliminar la tierra fina, facilitando así la observación de las pupas (Fig. 10a). Una vez colectadas, se deben poner en cámara húmeda debidamente situada en el laboratorio, manteniéndose en observación hasta por 15 días o, de ser el caso, hasta que emerjan los adultos. En el caso de los adultos, el monitoreo se realiza en el área del cultivo o en hospederos alternos (Fig. 10b).



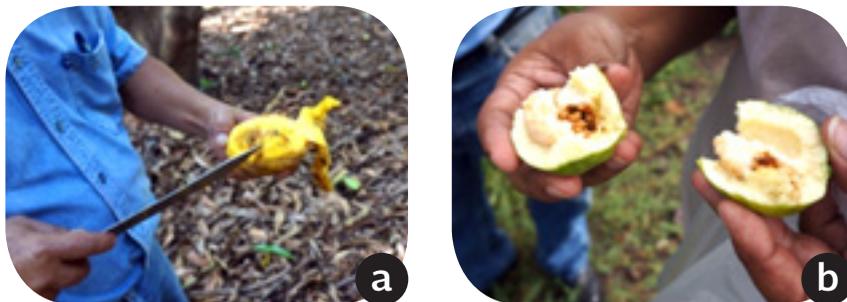
**Figura 10.**-Exploración en huertos de aguacate.

- a) Búsqueda de pupas de barrenadores en huertos de aguacate.  
b) Adulto del barrenador del hueso del aguacate *Stenoma catenifer*.

## Moscas de la Fruta

La presencia de las diversas especies de larvas de moscas de la fruta como *Anastrepha ludens* Loew, *A. obliqua* Macquart, *A. striata* Schiner y *A. serpentina* Wiedemann (Diptera: Tephritidae), generalmente coincide con la madurez del fruto y la caída del mismo (Fig. 11a y b). En los últimos estadios larvarios, el insecto abandona el fruto y se entierra a pocos centímetros de profundidad (4-8 cm), ahí se convierte en pupa y, después de algún tiempo, emerge el adulto que iniciará un nuevo ciclo de vida. En estos insectos, los estados de pupa y adulto son los más susceptibles a infección por HE; por esa razón, el muestreo debe dirigirse precisamente a estos estados de la plaga. En el caso del adulto, la búsqueda es directa, considerando síntomas o signos de micosis. En contraste, en el caso de las pupas, se deben tomar muestras de suelo a una profundidad de 10 cm; de estas muestras, se deben separar las pupas con una criba para, posteriormente, colocarse en cámara húmeda a 27°C, permitiendo el desarrollo de posibles HE.

Considerando que, tanto para las moscas de la fruta como para el conjunto de barrenadores del aguacatero, el estado de pupa es susceptible a ataque por HE, resulta factible hacer una búsqueda de estos hongos, a partir de la técnica del insecto trampa, utilizando el suelo generado después de la criba.



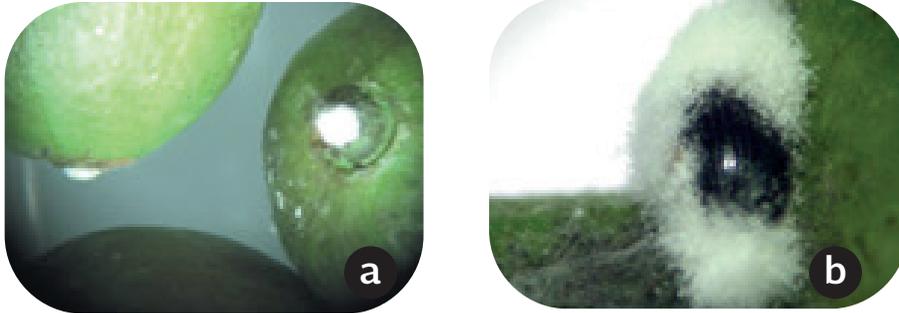
**Figura 11.-** Daños de mosca de la fruta.

- a) En mango.
- b) En guayaba.

### Broca del Café

La broca del café *Hypothenemus hampei* Ferrari (Coleoptera: Scolytidae), posee una extraña y compleja biología. Con excepción del breve periodo de vuelo que emplea para dispersarse y buscar al hospedero, la broca pasa el resto de su vida refugiada en el fruto de café; en él, encuentra el alimento necesario para sobrevivir y reproducirse, así como un refugio ideal para resistir las condiciones adversas del clima y escapar a sus enemigos naturales. Por ésta razón, el adulto es la fase más susceptible de ser infectada por HE y es la etapa a la que deben dirigirse los muestreos.

Los frutos de café con daño por broca, presentan una perforación en la cicatriz de la corola. En los episodios en los que este insecto ha sido atacado por *B. bassiana*, aparece un punto algodonoso de color blanco o crema, lo cual es indicativo de la presencia de micelio y conidios de este hongo, el cual se encuentra desarrollándose sobre el insecto (Fig. 12 a y b). La colecta de HE en broca de café, se puede dirigir directamente sobre los frutos en los que sea visible la presencia del micelio del hongo. Por otro lado, para la búsqueda de otras especies de HE asociadas a la plaga, se pueden muestrear los frutos caídos con daños de broca.



**Figura 12.- Broca de café.**

a) Infectada por *Beauveria bassiana*.

b) *Hypothenemus hampei* con *Beauveria bassiana*, cuerpo parcialmente micosado.

### Pulgones en cítricos

Si se considera el tipo de aparato bucal, picador–chupador, de los pulgones, los HE son los principales agentes patógenos de este grupo de insectos. Esto es debido a que los protozoarios, bacterias y virus entomopatógenos tienen acción vía estomacal y deben ser ingeridos para poder causar la enfermedad (Humber 1991); mientras que el modo de acción característico de los HE, es por contacto. Los áfidos son atacados por una diversidad de especies de HE (Fig. 13a, b, c, d y e), de los cuales destacan los Entomophthorales; a diferencia de los Hipocreales (ubicados anteriormente como Hyphomyctes), los cuales incluyen cientos de especies, pero solo pocas de ellas han sido reportadas como patógenos de áfidos (Feng *et al.* 1990, Yokomi 1994).

La búsqueda de HE en poblaciones de pulgones de cítricos, implica la colecta tanto de insectos vivos como muertos. Los brotes tiernos con pulgones, se depositan preferentemente en bolsas de papel para, en las siguientes 24 horas, ser analizados (Berlanga-Padilla 2002). Los insectos de coloración rojiza, además de aquellos que se encuentren adheridos en hojas o tallos, deben depositarse en contenedores o bolsas por separado.



**Figura 13.-** Pulgones de cítricos infectados con hongos entomopatógenos.

**a) insectos infectados adheridos a hojas. Pulgones infectados:**

**b) *Lecanicillium* c) *Neozygites* d) *Beauveria* e) *Isaria*.**

### Gallina ciega

Las principales especies de larvas edafícolas rizófagas conocidas como “gallina ciega” presentes en México son *Phyllophaga* spp., *Anomala* spp. y *Ciclocephala* spp., además de otros géneros de la familia Melolonthidae. Estas plagas representan un serio problema en varias regiones del país, ya que se alimentan de raíces de gramíneas, papa, cafeto, hortalizas, árboles frutales y forestales reportándose el mayor daño en el cultivo de maíz. Para la búsqueda de HE asociadas a estas plagas, la exploración debe dirigirse a suelo, y utilizar la técnica del insecto trampa como principal alternativa (Hernández-Velázquez *et al.* 2003).

La búsqueda directa de hongos entomopatógenos sobre larvas de gallina ciega, es en áreas cercanas a la raíz, donde se colectan los insectos de coloración roja, con manchas necróticas, aspecto algodonoso o polvoso, presentando diferentes tonalidades e incluso, es posible encontrar partes del insecto con signos de crecimiento de estos hongos (Fig. 14a, b y c). Cuando se realizan las labores culturales de terreno, específicamente en el rastreo, es el momento idóneo para la búsqueda, ya que las larvas quedan expuestas y se detectan fácilmente. Una vez recolectadas estas, se deben depositar individualmente en recipientes de plástico. Por otra parte, la búsqueda de hongos patógenos a gallina ciega también debe dirigirse a larvas vivas, las cuales son recolectadas y monitoreadas por 30 días para detectar micosis; es entonces cuando los insectos deben ser depositados, individualmente, en recipientes de plástico con alimento, ya sea un trozo de zanahoria o adicionando Peat Moss estéril y seco. Hecho esto, las larvas deben revisarse diariamente (Berlanga-Padilla *et al.* 2000).

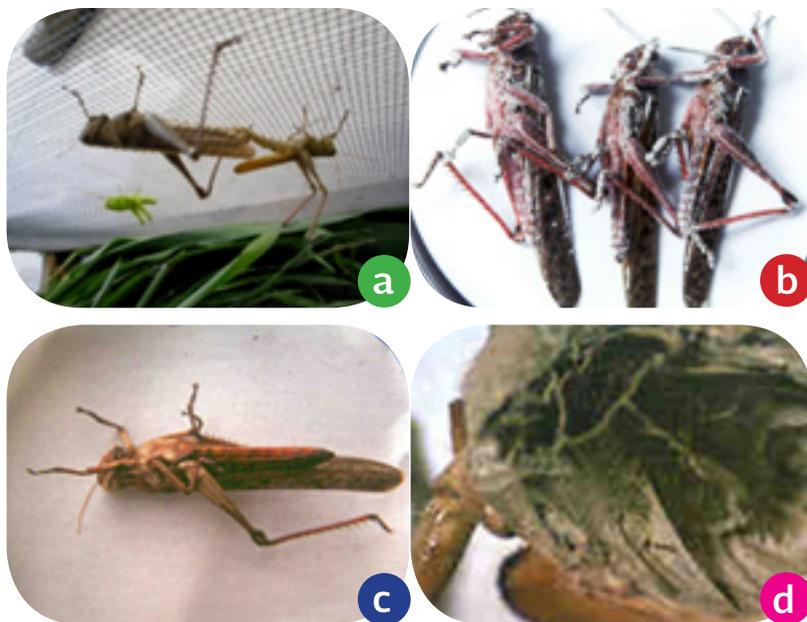


**Figura 14.-** Signos de la infección en larvas de gallina ciega.  
**a y b) Diferentes signos del desarrollo de *Beauveria bassiana*.**  
**c) Restos de larva y de estructuras de *Beauveria bassiana* sobre el suelo.**

### Langostas y chapulines

La exploración de hongos patógenos a *Schistocerca* spp. no es una tarea sencilla, especialmente si se considera que las áreas infestadas de langostas se caracterizan por ser extremadamente secas la mayor parte del año, las cuales son condiciones desfavorables para el desarrollo de los hongos. En la investigación hecha por Kooyman y Shah (1992), se recomienda hacer la búsqueda de HE utilizando una combinación de métodos como el monitoreo en poblaciones de acrididos, medios selectivos, la exposición del insecto a suelo y la captura de altas densidades de la plaga en jaulas, lo cual les propicia estrés, induciendo de esta forma el desarrollo de agentes infecciosos presentes en la población (Fig. 15a y b).

La búsqueda directa se debe realizar en sitios donde se ha observado la presencia de la plaga, colectando insectos, vivos o muertos, que presenten una coloración que los diferencie del resto de la población; también deben colectarse aquellos con poca movilidad, e incluso aquellos que estén secos, ya que las langostas infectadas con *M. acridum*, esporulan en condiciones de poca humedad, en la parte interna del cuerpo, (Fig. 15c y d) y no hacia fuera como sucede en la mayoría de los casos de infección por HE (Hernández-Velázquez *et al.* 1997).



**Figura 15.- Langosta**

- a) Confinadas en jaulas para inducir el desarrollo de patógenos.
- b) Adultos de *Schistocerca piceifrons* infectadas con *Metarhizium acridum*.
- c) Adulto de *Schistocerca piceifrons* seco.
- d) Esporulación interna de *Metarhizium acridum* en *Schistocerca piceifrons*.

# LITERATURA CITADA

**Ali-Shtayeh, M.S., B.M.M. Abdel-Basit & M.J. Rana. 2002.** Distribution, occurrence and characterization of entomopathogenic fungi in agricultural soil in the Palestinian area. *Mycopathologia* 156:235-244.

**Alves, B. S. 1986.** Fungos entomopatógenicos. pp. 73-126. En: Alves S.B. (ed.), *Controle microbiano de insectos*. Ed. Manole. 417 p.

**Barbercheck, M.E. 1992.** Effect of soil physical factors on biological control agents of soil insect pests. *Florida Entomologist* 75:539-548.

**Barnett, H.L. & B.B. Hunter. 1998.** *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. Fourth Edition. The American Phytopathological Society, Minnesota, 218 p.

**Berlanga-Padilla, A.M. 2002.** Detección de hongos patógenos de áfidos en cítricos en Colima, México. En: H.C., Arredondo-Bernal, M.A. Mellín-Rosas, P. Pérez-Serrato y J.M. Martínez-Soriano (eds.). *Control biológico del pulgón café de los cítricos *Toxoptera citricida* vector del virus de la tristeza de los cítricos*. (pp. 151-157) SAGARPA. México 186 p.

**Berlanga-Padilla, A.M., V.M. Hernández-Velázquez & M. Nájera-Rincón. 2000.** Hongos entomopatógenos de gallina ciega *Phyllophaga* spp. (Coleoptera: Melolonthidae) nativos del occidente de México. En: *Memoria del XXIII Congreso Nacional de Control Biológico*. (pp. 38-41) Sociedad Mexicana de Control Biológico. Universidad de Guanajuato.

**Cabrera, R.I. 1977.** Estudio en Cuba de *Hirsutella thompsonii* Fisher. *Control biológico del ácaro del moho (*Phyllocoptruta oleivora*, Ashm)*. *Agrotecnia de Cuba*. 9(1):3-11.

**Domínguez, B., M. Bravo, H. González & C. López. 1988.** *Plagas de frutales*. Centros de Entomología y Acarología. Colegio de Posgraduados. México. 240 p.

**Feng, M. G., J.B. Johnsonand & L.P. Kish. 1990.** Survey of entomopathogenic fungi natural infecting cereal aphid (Homoptera: Aphididae) of irrigated grain crops in southwensfern Idaho. *Environmental Entomology* 19(5):1534-1542.

**Fernandez, E.K.K., C.A.Keyser, D.E.N. Rangel, R.N. Foster & D. W. Roberts. 2010.** CTC medium: A novel dodine-free selective medium for isolating entomopathogenic fungi, especially *Metarhizium acridum*, from soil. *Biological Control* 54:197-205.

**Ferron, P. 1978.** Biological control of insect pest by entomogenos fungi. *Ann. Rev. Entomol.* 23:409-412.

**Ferron, P. 1981.** Pest control by the fungi *Beauveria* and *Metarhizium*. In: H.D. Burges (ed.), *Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980*. (pp. 465-481) Academic Press. London and New York.

**Fransen, J.J. 1990.** Natural enemies of whiteflies: fungi. In: D. Gerling (ed.), *Whiteflies: their bionomics, pest status and management*. (pp. 187-210) Intercept. UK.

**Goettel, M.S. & D. Inglis. 1997.** Fungi: Hyphomycetes. In: L.A. Lacey (ed.), *Manual of Techniques in Insect Pathology*. (pp. 213-248) Academic Press, Londres.

**Hernández-Velázquez, V.M., A.M. Berlanga-Padilla & J. F. Pérez-Domínguez. 2003.** Hongos patógenos de “gallina ciega” *Phyllophaga spp.* (Coleoptera: Melolonthidae) de Jalisco y Nayarit. En: *Memoria del XXVI Congreso Nacional de Control Biológico*. (pp. 276-281) Sociedad Mexicana de Control Biológico. Guadalajara Jal.

**Hernández-Velázquez, V.M., A.M. Berlanga-Padilla & E. Garza-González. 1997.** Detección de *Metarhizium flavoviride* sobre *Schistocerca piceifrons piceifrons* (Orthoptera: Acrididae) en la Isla Socorro, Archipiélago de Revillagigedo, México. *Vedalia* 4:45-46.

**Hu, G. & R. J. St. Leger. 2002.** Field studies using a combinant mycoinsecticide (*Metarhizium anisopliae*) reveal that it is rhizosphere competent. *Applied and Environmental Microbiology* 68:6383-6387.

**Humber, R.A. 1991.** Fungal pathogen of aphids. In: D.C. Peters, J.A. Webster & S.C. Chiouber (eds.), *Proceeding Aphid-Plant interactions to Molecules*. (pp. 45-56) USDA/Agricultural Research Service Oklahoma State University.

**Humber, R.A. 2012.** Identification of entomopathogenic fungi. In: L. Lacey (ed.), *Manual of techniques in insect pathology*. (pp. 1-14) Academic Press. 484 p. Second Edition.

**Humber, R.A. 2013.** USDA-ARSEF Collection of Entomopathogenic Fungal Cultures: Catalogue of strains. Biological Integrated Pest Management Research Robert W. Holley Center for Agriculture & Health 538 Tower Road Ithaca, New York 14853-2901 (USA).

**Kaya, H.K. & F.E. Vega. 2012.** Scope and basic principles of insect pathology. In: F.E. Vega & H.K. Kaya (eds.), *"Insect Pathology"*. (pp. 1-12) Elsevier Inc.

**Keller, S., P. Kessler & C. Schweizer. 2003.** Distribution of insect pathogenic soil fungi in Switzerland with special reference to *Beauveria brongniartii* and *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol*, 48:307-319.

**Klingen, I., J. Eilenberg & R. Meadow. 2002.** Effects of farming system, field margins and bait insect on the occurrence of insect pathogenic fungi in soils. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 91:191-198.

**Kooyman, C. & P. Shah. 1992.** Exploration for locust and grasshopper. In: C.J. Lomer & C. Prior (eds.), *Biological control of locust and grasshoppers*. CAB International Redwood Press Ltd. Melksham, UK.

**Lacey, L. & L.F. Solter. 2012.** Inicial Handling and diagnosis of diseased invertebrates. In: L. Lacey (ed.), Manual of techniques in insect pathology. (pp. 1-14) Academic Press. 484 p. Second edition.

**Ley General de Vida Silvestre.** Última reforma. DOF. 19-03-2014.

**Lecuona, R.E. 1996.** Técnicas empleadas con hongos entomopatógenos. En: R.E. Lecuona (ed.), Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga (pp. 143-150).

**McCoy, C.W., R.A. Samson & D.G. Boucias. 1988.** Entomogenous fungi. In: C.M. Ignoffo, (ed.), CRC Handbook of natural pesticides. Volume V Microbial insecticides Part A entomogenous, protozoa and fungi. (pp. 151-236) CRC Press, Inc. Boca Raton, FL.

**Meyling, N.V. & J. Eilenberg. 2007.** Ecology of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological control. *Biological Control* 43:145-155.

**Meyling, N.V. 2007.** Methods for isolation of entomopathogenic fungi from the soil environment. Laboratory manual. Department of Ecology, Faculty of Life Sciences, University of Copenhagen.

**Norma Internacional de Medidas Fitosanitarias 2. 2007.** Marco para el análisis de riesgo de plagas. Roma, CIPF, FAO.

**Pendland, J.C. 1982.** Resistant structures in the entomopathogenic hyphomycetes, *Nomuraea rileyi* an ultrastructural study. *Canadian Journal of Botany.* 60:1569-1575.

**Poinar, O.G. & M.G. Thomas. 1978.** Diagnostic manual for the identification of insect pathogens. Plenum Press. New York.

**Prior, C. 1992.** Discovery and characterization of fungal pathogens for locust and grasshopper. In: C.J. Lomer and C. Prior (eds.), CAB International. Biological control of locusts and grasshoppers. (pp. 159-180) CAB International. Redwood Press Ltd, Melksham, UK 394 p.

**Realpe A., F. J., P. A. E. Bustillo, & N. J. C. López. 2007.** Optimización de la cría de *Galleria mellonella* (L.) para la producción de nematodos entomopatógenos parásitos de la broca del café. Cenicafé 58(2):142-157.

**Tanada, Y. & H.K. Kaya. 1993.** Insect Pathology. Academic Press, INC. San Diego, California. 666 p.

**Yokomi, R.K. 1994.** Potential of biological control of *Toxoptera citricida* (Kirkaldy). USDA, ARS. Horticultural Research Laboratory. Orlando, FL.

**Zimmermann, G. 1986.** The *Galleria* bait method for detection of entomopathogenic fungi in soil. Journal of Applied Entomology 102:213-215.



# ANEXO 1

## MEDIOS SELECTIVOS

### Medio para *Beauveria*

- Infusión de avena.....2%
  - Agar.....2%
  - Dodina..... 550 µg/mL
  - Clortetraciclina.....5 µg/mL
  - Cristal violeta.....10.0 µg/mL
  - Agua.....1000 mL
- Esterilizar a 120°C por 20 minutos

### Medio para *Beauveria*

- Bactopeptona.....0.3%
  - Agar .....1.5%
  - CuCl<sub>2</sub>.....0.2 mg/mL
  - Cristal violeta ..... 2 µg/mL
  - Agua destilada..... 1000 mL
- Ajustar el pH a 10  
Esterilizar a 120°C por 15 min

### Medio para *B. brongniartii*

- Peptona..... 10%
  - Glucosa..... 20%
  - Agar.....12%
  - Agua..... 1000 mL
- Esterilizar a 120°C por 20 min  
Ajustar pH a 6.3  
Adicionar a 50-60°C
- Estreptomicina..... 600 µg/mL
  - Tetraciclina..... 50 µg/mL
  - Dodina ..... 100 µg/mL
  - Cicloheximida ..... 50 µg/mL

### Medio para aislar *Metarhizium* de suelo

- Agar.....20.0 g
  - Neopectona.....6.0 g
  - Glucosa.....10.0 g
  - KHPO<sub>4</sub>.....0.5 g
  - MgSO<sub>4</sub> 7 H<sub>2</sub>O.....1.0 g
  - Agua destilada.....1000 mL
- Esterilizar a 120°C por 15 min y  
Adicionar a 55°C
- Cicloheximida.....200 g
  - Cloranfenicol.....200 g
  - Estreptomicina.....100 mg
  - Eritrocina.....80 mg

### Medio para *Metarhizium*

- Glucosa ..... 1%
  - Peptona ..... 1%
  - Oxgall..... 1.5%
  - Agar ..... 3.5%
  - Agua .....1000 mL
- Esterilizar a 120°C por 15 min y  
Adicionar a 55°C
- Dodina.....10 µg/mL
  - Cicloheximida.....250 µg/mL
  - Cloranfenicol.....500µg/mL

### Medio para *Metarhizium acridum*

- APD Suplementado con:
- Tiabendazol.....0.001 g/L
  - Cicloheximida.....0.25 g/L
  - Cloranfenicol.....0.25 g/L

## Medio para *Hirsutella thompsonii*

- Harina de soya.....8%
- Melasa.....2%
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.....1.5 mg/mL
- MgSO<sub>4</sub>.....0.5 mg/mL
- CaCl<sub>2</sub>.....0.01 mg/mL
- Esterilizar a 120°C por 20 minutos

## Medio para *Metarhizium rileyi* (= *Nomuraea rileyi*)

- Neopeptona.....10.0 g
- Extracto de levadura.....10.0 g
- NaNO<sub>3</sub>.....40.0g
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.....5.0 g
- KCl.....1.5 g
- MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O.....0.5 g
- FeSO<sub>4</sub>.....0.01 g
- ZnSO<sub>4</sub>.....0.01 g
- Agar.....15.0 g
- Agua destilada.....1000 mL
- Esterilizar a 120°C por 20 minutos

## Medio H

- Sacarosa.....10.0 g
- Dextrosa.....5.0 g
- Extracto de levadura.....5.0 g
- Peptona.....0.5 g
- Agar.....15.0 g
- Agua destilada .....1000 mL
- Esterilizar a 120°C por 15 miN

## Medio para *Paecilomyces lilacinus*

- Papa dextrosa agar.....3.9%
- NaCl.....1-3%
- Tergitol.....0.1%
- Pentacloronitrobenzeno.....500 µg/mL
- Benomilo.....500 µg/mL
- Sulfato de estreptomicina.....100 µg/mL
- Clortetraciclina HCl .....50 µg/mL

## Medio para *Lecanicillium*

- L-sorbosa.....2 g
- L-asparagina.....2 g
- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.....1 g
- MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O.....0.5 g
- FeNaEDTA.....0.01 g
- Agar.....20 g
- Agua.....1000 mL
- Esteptomicina SO<sub>4</sub>.....0.3 g
- Clortetraciclina HCl.....0.05 g
- Pentacloronitribenceno.....0.8 g
- NaB<sub>4</sub>O<sub>7</sub> · 10H<sub>2</sub>O.....1.g
- Ajustar PH 4.0 con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 10%

## Agar Dextrosa Sabouraud - yema de huevo y leche (Medio para Entomophthorales)

- Sabouraud Dextrosa Agar .....80 %
- Mezcla de yema de huevo (40%) y leche (60%).....20 %

## Materiales y preparación:

- Sabouraud agar.....45 g
- Agua.....1000 mL
- Esterilizar a 120°C por 30 minutos
- Agar extracto de levadura dextrosa:
- Dextrosa.....20 g
- Extracto de Levadura.....10 g
- Agar.....20 g
- Agua.....1000 mL
- Esterilizar a 120°C por 30 minutos

**- Leche:**

Esterilizar toda la leche a 120°C por 30 min y conservar en refrigeración.

**- Yema de huevo:**

Colocar los huevos en una mezcla de hipoclorito de sodio (800 mL, 2%) y alcohol (200 mL, 90%) durante 10 min para desinfectar la superficie. En seguida sobre la flama del mechero se separa la clara del huevo, se flamea el borde del huevo y se deja caer la yema sobre una probeta de 250 mL. Se adicionan 100 mL de leche estéril y se agita con una varilla de vidrio. Esta mezcla se incorpora al medio extracto de levadura-dextrosa-agar en el intervalo de temperatura de entre 50-60°C, se agita y en seguida se agrega el agar Sabouraud.

# ANEXO 2

## DIETAS DE CRÍA PARA *Galleria mellonella*

### 1) Dieta para la larva de estadios jóvenes (Meyling 2007)

180 g de miel  
260 g de harina de trigo  
180 g de glicerina  
80 g levadura de cerveza seca  
50 g de cera de abeja  
50 g de salvado de trigo

Miel, glicerina y cera de abeja se funden en un recipiente (sin hervir). Retirar del fuego.

Añadir la levadura de cerveza y luego la harina de trigo. A continuación, añadir el salvado de trigo y mezclar. Estos se pueden mantener en el refrigerador hasta su uso.

### 2) Dieta para larvas grandes (Meyling 2007)

280 g de miel  
240 g de glicerina  
40 g de levadura de cerveza  
400 g de alimentos para perros (por ejemplo Pedigree Junior)  
100 g de avena  
100 g de salvado de trigo

Mezclar la miel, glicerina y la levadura de cerveza y añadir la mezcla de alimentos de perro. Añadir los copos de avena y salvado de trigo. Si la mezcla es demasiado grasosa añadir más avena y salvado de trigo. Mantenga la comida refrigerada y añadir el alimento a las cajas con larvas grandes.

**3) Dieta *Galleria mellonella* (Realpe et al. 2007)**

464 g de salvado de maíz  
69 g de levadura seca.  
67 g de cera de abejas  
207 g de glicerina  
193 g de miel de abejas

Se mezclan el salvado de maíz y la levadura, aparte se derriten la cera de abeja y se adiciona a la primera mezcla, posteriormente se adicionan la glicerina y la miel.

**4).- Dieta para *Galleria mellonella* (Ali-Shtayeh et al. 2002)**

500 g Salvado  
25 g de leche en polvo  
25 g de harina de maíz  
75 g de harina de trigo  
75 mL de glicerina  
150 mL de miel de abeja  
100 mL de agua

Los ingredientes de la dieta se mezclan y se esterilizan a 121°C durante 30 min.

**5).- Dietas con cereales**

**A) Nestum 4 cereales**

1200 mL de Nestum 4 cereales  
5 g de vitaminas para pollos  
Una pizca de polen  
100 mL de miel de abeja  
150 mL de glicerol  
50 mL de agua

Se realiza una mezcla de los ingredientes sólidos y otra de los líquidos una vez integrados se mezcla sólidos y líquidos. La dieta se puede conservar en refrigeración hasta su uso.

### **B) Harina de arroz Gerber**

300 g de harina de arroz 1a etapa marca Gerber

37.5 g de salvado (esterilizado)

75 g de levadura

77.5 mL de miel de abeja

150 mL de glicerina

Una vez esterilizado el salvado se mezcla con la harina de arroz y la levadura, por separado se calientan la miel y la glicerina (sin hervir) se añaden a la primera mezcla y se homogeniza. La dieta se puede conservar en refrigeración hasta su uso.

### **6) Dieta de *Tenebrio molitor* ([www.mexicogallero.net/index.php](http://www.mexicogallero.net/index.php))**

Harina de avena 25%

Harina de trigo 25%

Engorda de pollo 15% (Purina)

Salvado 35%

Alimentar regularmente con trozos de manzana, papa, zanahoria, jícama y diente de león como fuentes de humedad.

Sugerencia de como citar este documento:

Berlanga-Padilla A.M., M.A. Ayala-Zermeño, R. Montesinos-Matías & J.C. Rodríguez-Rodríguez. 2016. Manual de Exploración para la Colecta de Hongos Entomopatógenos. Centro Nacional de Referencia de Control Biológico. Dirección General de Sanidad Vegetal. SAGARPA. SENASICA. Tecomán, Colima, México. Pp. 54. ISBN: EN TRAMITE

[www.sagarpa.gob.mx](http://www.sagarpa.gob.mx)



[www.senasica.gob.mx](http://www.senasica.gob.mx)

"Este programa es público, ajeno a cualquier partido político.

Queda prohibido el uso para fines distintos a los establecidos en el programa".

Quejas • Denuncias

Órgano Interno de Control en el SENASICA

+52(55) 5905 1000, ext: 51648

+52(55) 3871 8300, ext: 20385

Dudas sobre:

- Campañas Fito o Zoonosológicas
- Movilización de Productos Agroalimentarios y Mascotas

01 800 987 9879